

团 体 标 准

T/GDCDC 0XX—202X

化妆品与原料毒性角质细胞试验

Keratinocyte test for toxicity of cosmetics and raw materials

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2024 - xx - xx 发布

2024 - xx - xx 实施

广东省日化商会 发布

目 次

前 言	II
1 范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语、定义和缩略语	3
4 原理	4
5 试剂	4
6 材料	5
7 仪器和设备	5
8 试样的制备	5
9 试验过程	6
10 计算	8
11 质量控制	9
12 结果报告	9
参考文献	11

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广东省日化商会提出并归口。

本文件起草单位：XXXXX。

本文件主要起草人：XXXXX。

化妆品与原料毒性角质细胞试验

1 范围

本文件规定了化妆品及其原料毒性的角质细胞试验方法的基本原理、试验准备、试验过程、结果和报告。

本文件适用于可无菌过滤的化妆品、水溶性较好或可有机溶剂溶解成澄澈母液的原料的细胞毒性作用的筛选和检测；不适用于粘稠精华液、膏霜等。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

人永生化角质细胞 human immortalized keratinocytes

源于正常成年人的皮肤组织，在体外培养后自然转化的永生化的人角质细胞。

3.1.2

细胞活率/细胞活性 cell viability

在细胞群体中活细胞所占的百分比。

3.1.3

相对细胞活性 relative cell viability

通过与溶剂（阴性）对照组的相关性来表达的细胞活性，对照组除了未经受试化学物质处理外，整个试验过程与试验组一样。

3.1.4

10%抑制浓度 10% inhibition concentration, IC_{10}

在一定条件下使细胞生长和活力抑制 10%的受试物浓度。

3.1.5

半数抑制浓度 50% inhibition concentration, IC_{50}

在一定条件下使细胞生长和活力抑制 50%的受试物浓度。

3.1.6

剂量-效应关系 dose-response relationship

表示所给受试物的剂量使试验系统群体中某种毒性作用发生率之间的关系。

3.1.7

细胞毒性 cytotoxicity

受试物引起细胞损害或死亡的能力。

3.1.8

细胞培养 cell culture

具有相似功能的一群动物细胞在特定的营养条件下生存和增殖的过程。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DMEM:杜氏改良依格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO:二甲基亚砷(Dimethyl Sulfoxide)

EDTA: 乙二胺四乙酸(Ethylenedinitrilotetraacetic Acid)

FBS: 胎牛血清(Fetal Bovine Serum)

PBS: 磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline)

MTT: 噻唑蓝(Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide)

LDH: 乳酸脱氢酶检测(LDH Cytotoxicity Assay)

CCK-8: 细胞增殖与毒性计数试剂盒(Cell Counting Kit-8)

SDS: 十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate)

INT: 2-(对碘苯基)-3-(对硝基苯)-5-苯基氯化四唑(2-p-iodophenyl-3-nitrophenyl tetrazolium chloride)

4 原理

本试验采用人永生角质细胞系HaCaT, 应用LDH、MTT、CCK-8三种测定活细胞与损伤细胞数量的终点法检测受试物的细胞毒性。

MTT可被琥珀酸脱氢酶还原生成结晶状的深紫色产物甲臜, 在特定溶剂存在的条件下, 可以被完全溶解。通过酶标仪可以测定570nm波长的吸光度, 即可测出活细胞的数量。细胞增殖越多越快, 则吸光度越高; 细胞毒性越大, 则吸光度越低。

CCK-8法使用水溶性四唑盐WST-8甲臜染料作为显色底物, WST-8被细胞内的脱氢酶还原产生水溶性的甲臜染料。细胞数量与甲臜染料成正比关系, 通过酶标仪可以测定450nm波长的吸光度, 即可测出活细胞的数量。

LDH法的原理是在乳酸脱氢酶的作用下, NAD^+ 被还原生成NADH, NADH和INT被硫辛酰胺脱氢酶催化反应生成 NAD^+ 和深色甲臜。吸光度与乳酸脱氢酶活性成线性正相关, 通过酶标仪可以测定490nm波长的吸光度, 即可测出活细胞的数量。

三种方法相比较, 各有适用情景。MTT法最经济实惠, 适合需要控制经济成本的应用环境, 但试验手法操作不当会产生较大误差; CCK-8法和LDH法操作更简便, 整体流程用时最短, 适合需要控制时间成本的应用场景。MTT法不适用悬浮细胞。

5 试剂

5.1 一般规定

除非另有规定, 所用试剂均为分析纯, 水为GB/T 6682规定的一级水。与细胞培养相关试剂、耗材应作无菌处理。

5.2 细胞材料

人永生角质细胞系HaCaT。

5.3 细胞培养涉及试剂

5.3.1 DMEM 培养基: 含 2mM L-谷氨酰胺和 4.5g/L 葡萄糖。可选用各种商品供应的粉末培养基按生产厂商提供资料配制, 并用 0.22μm 的滤膜过滤除菌, 储存于 4℃ 不超过 1 个月。

5.3.2 完全培养基: 常规培养时, 完全培养基配方为 90%DMEM、10%FBS、100U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素。试验时, 完全培养基配方为 90%DMEM、10%FBS、100U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素。

5.3.3 PBS: 称取 8gNaCl、0.2gKCl、1.44g Na_2HPO_4 、0.24g KH_2PO_4 , 溶于 900mL 双蒸水, 调节 pH 至 7.2, 用双蒸水定容至 1000mL, 115℃ 高压灭菌 15min, 储存于 4℃ 不超过 1 个月。

5.3.4 0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA: 称取 0.25g 胰蛋白酶干粉和 0.02gEDTA, 先加入少量 PBS 溶液, 4℃ 低速搅拌, 完全溶解后调节 pH 至 7.2, 用 PBS 溶液定容至 100mL, 过滤除菌, 储存于-20℃, 使用前于 37℃ 预热。

5.3.5 FBS。

5.4 检测涉及试剂

5.4.1 0.4%台盼蓝试剂盒或台盼蓝: 生物级, 使用 PBS 配制成 0.4%的储备工作液, 避光备用, 6 月内

使用完毕。

5.4.2 CCK-8 试剂盒。

5.4.3 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒或 MTT 粉末（纯度 \geq 97.0% (HPLC)：使用 PBS 配制成 5mg/mL 的储备工作液，4℃避光备用，1 月内使用完毕）。

5.4.4 LDH 细胞毒性检测试剂盒。

5.4.5 制备样品母液推荐溶剂：DMSO、无水乙醇、丙二醇、灭菌超纯水、PBS。

5.5 毒性阳性试剂

SDS:使用培养基配制为10mg/mL工作储备液，现配现用。

6 材料

6.1 微孔滤膜：0.22 μ m。

6.2 平底细胞培养板：96 孔。

6.3 细胞培养瓶。

6.4 无菌旋盖离心管：15mL 和 50mL。

6.5 无菌离心管：1.5mL 和 2.0mL。

6.6 一次性加样槽。

7 仪器和设备

7.1 天平：感量为 0.1mg。

7.2 生物安全柜：生物 II 级。

7.3 恒温水浴锅：37℃ \pm 1℃。

7.4 二氧化碳培养箱：37℃，5%CO₂。

7.5 pH 计：精度 \pm 0.1。

7.6 离心机：能够进行 150g~250g 离心。

7.7 涡旋振荡器。

7.8 微孔板酶标仪或微孔板分光光度计，配置 450nm、490nm、570nm 滤光片。

7.9 高压灭菌器。

7.10 无菌微量移液器：10 μ L，200 μ L，1000 μ L。

7.11 倒置显微镜。

7.12 细胞计数仪或血球细胞计数板。

7.13 实验室要求：细胞实验室（万级实验室），设有洁净操作间和缓冲间，洁净操作间洁净度应达到万级，运行状态下，室内温度保持在 18℃~26℃，湿度保持在 45%~65%，静压差 $>$ 10Pa。洁净工作台的洁净度达到百级。

8 试样的制备

8.1 受试物准备

8.1.1 水溶性好的样品应使用 PBS 或超纯水配制成高浓度母液后，经完全培养基稀释待用。

8.1.2 水溶性差的样品在可经过 DMSO、无水乙醇等有机溶剂溶解成母液待用。

8.1.3 关于受试物特性与受试物量：避光物质需标签标识且提前做好避光措施，低温存放物质需标签标识。

8.1.4 在无菌条件中，使用 2.0mL 无菌离心管完成样品母液制备（制备量应大于 1.5mL），0.22 μ m 无菌滤膜过滤后备用。

8.2 阳性对照

8.2.1 使用培养基稀释 SDS 工作储备液，系列测试浓度为 10 μ g/mL、30 μ g/mL、60 μ g/mL、90 μ g/mL、120 μ g/mL、150 μ g/mL、180 μ g/mL。

9 试验过程

9.1 细胞准备

9.1.1 细胞的维护和培养

取冷冻保存的细胞培养物以 1×10^6 个细胞接种到常规 T25 培养基中用于试验，使用 50 代以内的细胞进行培养和测试。

用于试验的细胞在检测前至少传代一次，传代的比例以 1:3 到 1:4 为佳，刚复苏的细胞应适当提高传代比例，相差倒置显微镜观察细胞形态学的改变或细胞粘附特性。

9.2 细胞毒性检测

9.2.1 消化细胞

将达到对数生长期的细胞接种于 96 孔板用于检测。操作如下：当细胞培养瓶中的角质细胞 50%~80% 融合时，去除培养液，用 5mL~10mL 无菌 PBS 清洗 2 次，轻轻晃动，确保不会产生明显泡沫，去除清洗液。

将胰酶/EDTA 液体加入到培养瓶进行细胞消化，每 25cm^2 培养瓶底面积对应使用 1mL 胰酶/EDTA 液体，室温孵育 3min~10min，孵育过程中不时观察，当超过 50% 的细胞变圆时，轻轻拍打培养瓶使细胞脱壁。或其他经过验证的细胞消化方法。

当绝大多数细胞脱壁时，取 1~5 倍胰酶/EDTA 液体体积的完全培养基轻轻吹打并收集细胞，将细胞悬液转移至离心管。设置离心机 220g，将离心管放入离心机中离心 5min，去除上清液，保留底部细胞沉淀。

9.2.2 接种铺板

将完全培养液轻轻吹打，使重悬细胞沉淀形成均匀分布的单细胞悬液，使用血球计数板或者细胞计数器进行细胞浓度计数，细胞膜损坏的细胞将被 0.4% 台盼蓝染色液染成蓝色不透光球形或类球形，状态较好的细胞呈现透光球形，测试用细胞宜 90% 以上的存活率。

将细胞悬液与 0.4% 台盼蓝染色液混合均匀后，取 $10\ \mu\text{L}$ 沿着盖玻片与血球计数板缝隙缓慢注入，静置片刻后于 4 倍显微镜下计算大格内细胞总数，计算活细胞数目与细胞存活率。根据使用说明使用自动细胞计数器进行细胞计数，计算活细胞数目与细胞存活率。

细胞计数后，使用多通道移液器进行细胞铺板。细胞悬液体积为 $100\ \mu\text{L}/\text{well}$ ，测试细胞毒性时活细胞数量为 $(1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4)$ cell/well。

9.2.3 加样

铺板培养 $24\text{h} \pm 1\text{h}$ 后添加样品。预先在倒置相差显微镜下观察细胞，确认细胞在整个微孔板上生长相对一致。

使用排枪加入含有 $100\ \mu\text{L}$ 培养基稀释 2 倍浓度的受试物，使其终浓度为设置浓度：C1、C2、C3、C4、C5 等，浓度宜采取倍半梯度稀释，设置溶剂对照，且试验平行 $n \geq 3$ 。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	VNC	VC1	VC2	VC3	VC4	VC5	VC6	VC7	VC8	VNC	PBS
C	PBS	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	NC	PBS
D	PBS	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	NC	PBS
E	PBS	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	NC	PBS
F	PBS	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	NC	PBS
G	PBS	NC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	NC	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

图 1 96 孔板加样图例

注：

C1~C8——八个浓度的受试物；

NC——试验培养基，有细胞；

VCI~VC8——八个浓度的受试物，无细胞；

PBS——空白对照，无受试物，无细胞。

9.2.4 镜检观察

细胞孵育后使用相差显微镜观察每个培养板，观察对照组与试验组细胞的生长特性。通过镜检评价表描述细胞培养物的形态，确定细胞毒性的量化得分并做好记录。

9.2.4.1 镜检评价

细胞毒性测试可通过形态学方法评定细胞损伤，此定性方法适合筛选鉴别，毒性的结果以定量结果为准。

用显微镜观察细胞，评价内容包括一般形态、空泡形态、脱落、细胞溶解和细胞膜完整性等方面的改变。当测试结果有异常，比如培养孔中有受试物染色、培养孔中有受试物沉淀，则可能导致检出吸光值比真实吸光值偏大。若同浓度下显色有较大差异，但细胞状态一致，显色差异可能由检出操作引起。

表1 细胞形态观察代码-细胞毒性分级

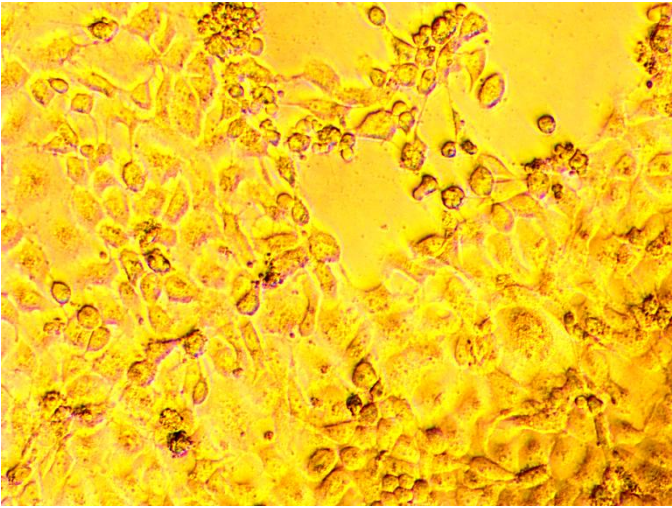
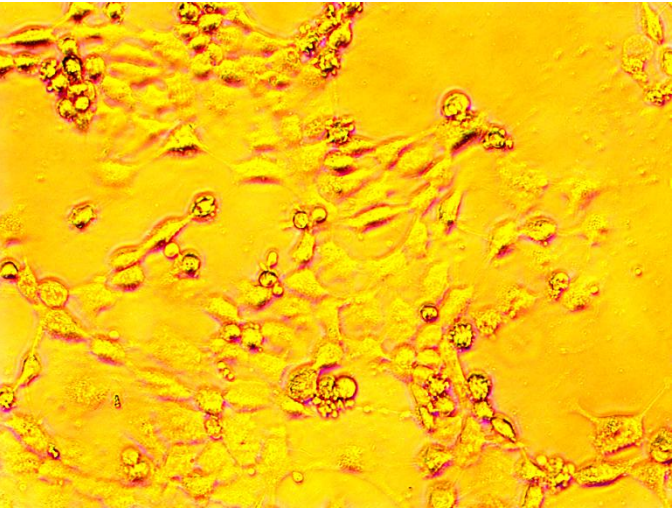
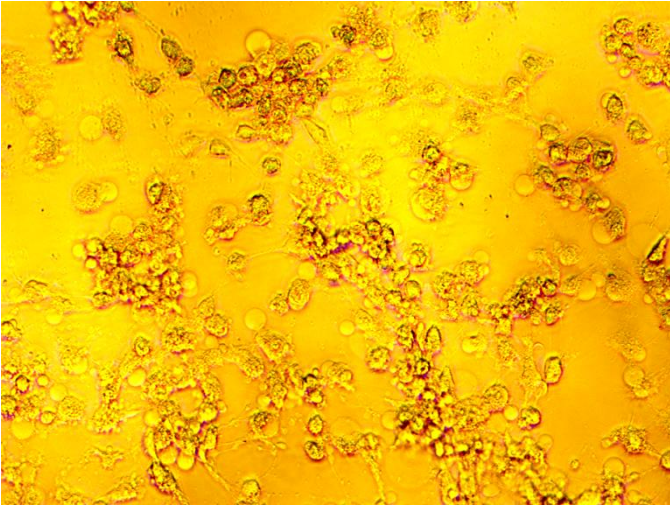
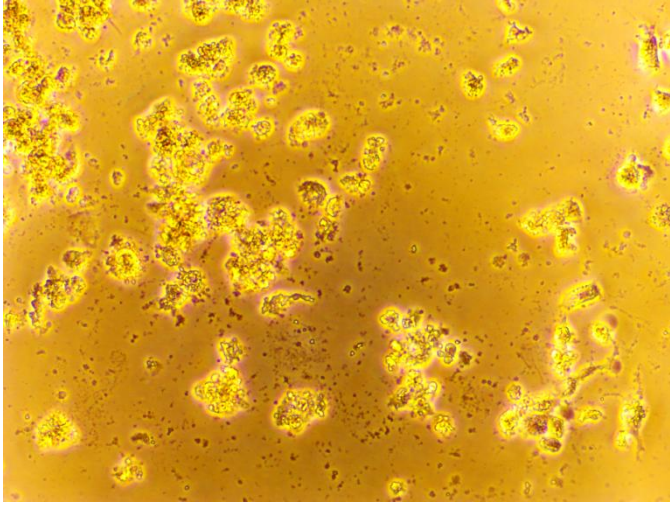
代码编号	内容	展示图
1	<p>正常细胞形态</p> <p>细胞与底部融合率高，贴壁细胞量多，视野内细胞形态正常舒展，有明显触角。极少数触角回缩、透光异常，这是正常的少数细胞衰老的现象。</p>	
2	<p>低水平细胞毒性</p> <p>贴壁细胞量多，有少许细胞脱落，视野内大部分细胞形态正常舒展，有明显触角。少数异常有空泡、触角回缩、粘附功能异常的现象。</p>	

表 1 细胞形态观察代码-细胞毒性分级（续）

代码编号	内容	展示图
3	<p>中水平细胞毒性</p> <p>贴壁细胞量较多,但可见少许细胞脱落,较多细胞形态异常,无明显触角或触角细长,贴壁面积小,细胞核涨大。</p>	
4	<p>高水平细胞毒性</p> <p>大量细胞脱落,贴壁细胞量少,细胞形态异常且无明显触角,贴壁面积变小。</p>	

9.2.5 检测

9.2.5.1 CCK-8 法检测

添加样品 48h±2h 后,小心去除原培养基后,添加含有 10%CCK-8 检测液的基础培养基至反应孔,反应 1h~4h,酶标仪设置中速震荡 10s~20s,设置 450nm 进行读数。

9.2.5.2 LDH 法检测

添加样品 48h±2h 后,小心去除原培养基后,添加含有 10%LDH 检测液的基础培养基至反应孔,培养箱孵育 1h~1.5h,分别取各孔上清液 120 μL,加入到一新的 96 孔板中,酶标仪设置中速震荡 10~20s,设置 490nm 进行读数。

9.2.5.3 MTT 法检测

添加样品 48h±2h 后,小心去除孔板中原培养基后,添加含有 10%MTT 工作液的基础培养基,反应 2h~4h 后,直至底部贴壁细胞均染色。去除废液,加入 100 μL DMSO 进行孵育 10min~60min,宜采用微孔板震荡仪,不时震荡细胞内的深紫色产物甲臜溶解至底部无细胞形态残留,酶标仪设置中速震荡 10s~20s,设置 570nm 进行读数。

10 计算

10.1 细胞存活率

$$\text{细胞存活率} = \frac{OD_{Cn} - OD_{Vcn}}{OD_{NC} - OD_{PBS}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- OD_{Cn}——第 n 个浓度的受试物测试孔的吸光值；
- OD_{Vcn}——第 n 个浓度的受试物对照孔的吸光值，无细胞；
- OD_{NC}——培养基对照组测试孔的吸光值；
- OD_{PBS}——PBS 对照孔的吸光值，无受试物，无细胞。

10.2 IC₅₀、IC₁₀ 计算

IC₁₀ 和 IC₅₀ 的计算是可选的，在出现毒性的剂量依赖效应时应当计算，应从细胞毒性曲线计算 IC₅₀、IC₁₀ 等相关数据，以%、g/mL 或 mmol/L 等单位符号表达，至少应保留两个有效数字。统计分析宜从以下两种方法选择。

- a) 图表法计算：以细胞存活率结果及其形成的图表判断。
 - b) 可采用非线性函数，构造多数剂量-反应曲线的代表模型。
- 函数分析宜通过统计学软件进行，应用前应检验曲线的符合程度 ($R^2 \geq 0.90$)。

11 质量控制

11.1 重现性判定

批内平行误差和重现试验的批间平均值标准误差 (Standard Deviation, SD) 均 $\leq 10\%$ ，则认为该试验具有重现性。当测试结果显示细胞明显增殖，即细胞存活率显著大于 100%，可通过计算变异系数 (Coefficient of Variance, CV) $\leq 10\%$ ，判定该试验具有重现性。

11.2 平行性判定

同一试验的重现试验，统计酶标仪测得的各组平行孔间吸光度的标准差 (Standard Deviation, SD) $\leq 10\%$ ，则认为试验平行性有效。

11.3 IC₅₀ 计算

细胞毒性测试中，低毒样品可能不出现 IC₅₀。计算 IC₅₀ 时，同一试验中，0%~50% 的细胞活性范围内至少应出现一个可以计算细胞毒性的值，同样 50%~100% 的细胞活性范围内至少应出现一个可以计算细胞毒性的值。

12 结果报告

12.1 试验结果

- 受试物毒性结果标识应包括下列内容：
- 受试物测试浓度范围内的结果；
 - 报告时应描述本次试验的有效性验证结果；
 - 在进行受试物间细胞毒性的比较时，可绘制受试物受试浓度与细胞存活率的浓度效应关系曲线；

——关于 IC_{10} 的报告：对比溶剂组，受试组的细胞存活率/细胞活性小于90%时，被认为开始出现细胞毒性；

——关于 IC_{50} 的报告：计算各受试物的 IC_{50} ，受试物 IC_{50} 越小代表毒性越强。

12.2 试验报告

试验报告应包括下列内容：

——识别被测样品所需全部资料，包括不限于样品编号、名称、生产批号、生产日期及保质期、生产及送检单位、样品物态描述；

——试验评价项目及评价起止时间；

——评价依据；

——试验材料和方法；

——试验结果和结论；

——报告日期；

——应有具有相关能力人员签批，并加盖检验单位有效公章。

参考文献

- [1] SN/T 2285-2009 化妆品体外替代实验室规范
 - [2] SN/T 3899-2014 化妆品体外替代试验 良好细胞培养和样品制备规范
 - [3] SN/T 2328-2009 化妆品急性毒性的角质细胞试验
-